

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ (VEGF) И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ (MMP) ПРИ ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМЕ КОНЕЧНОСТЕЙ

Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Хапаев Р.С.,
Нимаев В.В.

Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Среди причин развития первичной лимфедемы (ПЛ) определенное значение играют генетические факторы, молекулярные продукты которых участвуют в процессах ремоделирования кровеносных и лимфатических сосудистых сетей. Сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGFs) — ключевые регуляторы эндотелиальной функции клеток, ответственных за лимфо-, васкуло- и ангиогенез. Кроме того, регуляторами и лимфангиогенеза, и ангиогенеза могут выступать матриксные металлопротеиназы (MMP). Поскольку регуляторные регионы гена, кодирующего VEGF-A, как и регуляторные регионы генов MMP, полиморфны, возможно, что различный уровень их экспрессии, определяемый полиморфизмом этих регионов, может быть ассоциирован с развитием отеков, свойственных лимфедеме. Проанализирован полиморфизм двух регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF-A* (rs 699947 и rs 3025039) и полиморфизм промоторных регионов генов матриксных металлопротеиназ *MMP2* (rs 2438650), *MMP3* (rs 3025058), *MMP9* (rs 3918242) и их комбинаций у пациентов с первичной лимфедемой.

Выборка пациентов с первичной лимфедемой конечностей включала 72 человека (55 женщин и 17 мужчин) в возрасте от 18 до 81 года, в популяционную группу контроля включены 526 жителей г. Новосибирска (153 мужчины, 373 женщины) без хронических заболеваний, сопоставимые по возрасту с выборкой больных лимфедемой. Проведено типирование регуляторных регионов генов *VEGF* (rs 699947, rs 3025039), *MMP2* (rs 2438650), *MMP3* (rs 3025058), *MMP9* (rs 3918242). Выявлено 15 комплексных генотипов, позитивно ассоциированных с заболеванием. Анализ топологии генной сети выделил главные межгенные взаимодействия при развитии первичной лимфедемы. *MMP2* -1306 CC, *MMP9* -1562 CC и *VEGF* +936 CC формируют основные узлы в генной сети (53% от всех взаимодействий). Выявлен ряд достоверно различающихся комплексных генотипов у пациентов с ПЛ с нормальным индексом массы тела (ИМТ) (менее 25) и ожирением (ИМТ более 30). Так, частота комплексного генотипа *VEGF* +936 CC:*MMP3* -1171 5A6A:*MMP9* -1562 CC у пациентов с ожирением повышена более чем в пять с половиной раз относительно пациентов с нормальным ИМТ.

Полученные данные могут свидетельствовать об определенном значении полиморфизма анализируемых генов на патогенез развития первичной лимфедемы конечностей. Топологический анализ

Адрес для переписки:

Шевченко Алла Владимировна
Научно-исследовательский институт клинической
и экспериментальной лимфологии
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
Тел.: 8 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Address for correspondence:

Shevchenko Alla V.
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology
630060, Russian Federation, Novosibirsk, Timakov str., 2.
Phone: 7 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев, В.И. Коненков,
Р.С. Хапаев, В.В. Нимаев «Полиморфизм генов
фактора роста эндотелия сосудов (VEGF)
и матриксных металлопротеиназ (MMP) при
первичной лимфедеме конечностей» // Медицинская
иммунология, 2020. Т. 22, № 3. С. 497-506.
doi: 10.15789/1563-0625-POV-1913

© Шевченко А.В. и соавт., 2020

For citation:

A.V. Shevchenko, V.F. Prokofyev, V.I. Konenkov,
R.S. Khapaev, V.V. Nimaev "Polymorphism of vascular
endothelial growth factor gene (VEGF) and matrix
metalloproteinase (MMP) genes in primary limb lymphedema",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2020, Vol. 22, no. 3, pp. 497-506.
doi: 10.15789/1563-0625-POV-1913

DOI: 10.15789/1563-0625-POV-1913

генных сетей позволяет изучать структурно-функциональную организацию ген-генных взаимодействий для разработки подходов к персонализированной профилактике и терапии заболевания.

Ключевые слова: первичная лимфедема, гены матриксных металлопротеиназ, ген фактора роста эндотелия сосудов, генные сети, математическое моделирование

POLYMORPHISM OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENE (*VEGF*) AND MATRIX METALLOPROTEINASE (*MMP*) GENES IN PRIMARY LIMB LYMPHEDEMA

Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Konenkov V.I., Khapaev R.S., Nimaev V.V.

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Among the reasons of primary lymphedema development, a certain role belongs to genetic factors. The specific molecular products participate in remodeling of blood and lymphatic vascular networks. Vascular endothelial growth factors (VEGFs) are key regulators of endothelial functions of the cells, which are responsible for lympho- and vasculogenesis. Moreover, matrix metalloproteinases (MMP) may act as regulators of both lymphangiogenesis, and angiogenesis. Since the regulatory regions of *VEGFA* gene, as well as of *MMP* genes are polymorphic, one may suggest, that their different expression level, determined by these polymorphisms, could be associated with development of swellings typical for lymphedema.

We have analyzed gene polymorphisms in two regulatory regions of vascular endothelial growth factor-A *VEGF-A* (rs 699947 and rs 3025039), and matrix metalloproteinase genes *MMP2* (rs 2438650), *MMP3* (rs 3025058), *MMP9* (rs 3918242), and their combinations in the patients with primary lymphedema.

A group of patients with primary lymphedema included 72 subjects (55 women and 17 men) at the age of 18 to 81 years. Control group included 526 inhabitants of Novosibirsk (153 men, 373 women) without chronic diseases, comparable for age with lymphedema patients. We have performed typing of regulatory regions in *VEGF* (rs 699947, rs 3025039), *MMP2* (rs 2438650), *MMP3* (rs 3025058), *MMP9* genes (rs 3918242). Fifteen complex genotypes have been revealed that were positively associated with disease. Analysis of the gene network topology has outlined the main intergenic interactions upon primary lymphedema development. *MMP2-1306CC*, *MMP9-1562CC* and *VEGF+936CC* arrange the basic knots in the gene network (53% of total interactions). A number of significantly different complex genotypes was revealed at patients with primary lymphedema with normal body mass index (BMI < 25) and obesity (BMI > 30). Hence, frequency of complex genotype *VEGF+936CC: MMP3-1171 5A6A:MMP9-1562CC* in the patients with obesity is increased more 5.5-fold compared to the patients with normal BMI.

The data obtained may presume a certain value of the analyzed gene polymorphisms in pathogenesis of primary lymphedema. Topological analysis of gene networks allows to study the structural and functional organization of gene-gene interactions for development of approaches to individual preventive maintenance and therapy of the disease.

Keywords: primary lymphedema, matrix metalloproteinases genes, vascular endothelial growth factor gene, gene networks, mathematical modelling

Введение

Лимфатическая капиллярная и сосудистая сеть — важная часть общей сосудистой системы организма, осуществляющая циркуляцию тканевой жидкости, миграцию иммунокомпетентных клеток, абсорбцию холестерина и других липидов. Любой приобретенный или врожденный дефект в архитектуре или функции лимфатической системы может способствовать лимфатиче-

ской дисфункции и развитию лимфедемы, проявляющейся обширным некурабельным отеком одной или нескольких конечностей [3, 5]. Если причиной вторичной лимфедемы является паразитарная инфекция филяриоз или оперативное удаление молочной железы, то причины возникновения первичной лимфедемы (ПЛ) до сих пор не известны, хотя общепризнано, что определенное значение в ее развитии играют генетические факторы [1]. Особое внимание привлекают

гены, молекулярные продукты которых участвуют в процессах ремоделирования кровеносных и лимфатических сосудистых сетей.

Сосудистые эндотелиальные факторы роста (VEGFs) — ключевые регуляторы эндотелиальной функции клеток, ответственных за лимфо-, васкуло- и ангиогенез [9]. Как известно, процесс ангиогенеза начинается с активации эндотелиальных клеток. Ключевую роль в этом процессе играет фактор роста эндотелия сосудов). Семейство VEGF включает пептиды VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D и VEGF-E, плацентарные факторы роста PlGF-1 и PlGF-2, рецепторы VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3. Каждая из этих молекул исполняет свою «партию» в общем «оркестре» ангиогенеза. VEGF-A влияет на развитие новых и выживание незрелых кровеносных сосудов, связываясь с мембранными рецепторами VEGFR-1 и VEGFR-2. Факторы VEGF-C и VEGF-D, действующие через VEGFR-3 и VEGFR-2, регулируют главным образом лимфангиогенез. При этом VEGF-A — главный регулятор сосудистой проходимости и ангиогенеза, участвующий в экстравазии плазменных белков. Однако VEGF-A является не только главным стимулятором ангиогенеза, но и значимым лимфангиогенным фактором [9, 18]. Показано, что у пациентов с лимфатическим фибриозом повышены уровни не только VEGF-C и VEGF-D, но и VEGF-A [5]. Действие VEGF-A на лимфатические эндотелиальные клетки может быть как прямым, так и опосредованным, например, при участии макрофагов, продуцирующих лимфангиогенные факторы, либо путем повышения экспрессии VEGF-C — непосредственно регулятора лимфангиогенеза [22].

Помимо этой регуляторной сети, регуляторами и лимфангиогенеза, и ангиогенеза могут выступать матриксные металлопротеиназы (MMP) [15]. Матриксные металлопротеиназы известны не только как ферменты системы протеолиза, но и как ангиогенные факторы, которые, имея определенные особенности доменных структур, действуют на коллаген и протеогликановый матрикс, регулируя ремоделирование ткани сосудов [4, 10]. Вклад MMP в лимфангиогенез показан [6, 11], однако слабо исследован. Среди всех MMP именно MMP-2 и MMP-9 экспрессируются лимфатическими эндотелиальными клетками (LECs) и деградируют коллаген IV типа, выстилающий стенки лимфатических сосудов [11]. Полиморфизм генов *MMP* ассоциирован с целым рядом заболеваний, таких как опухолевые образования, метастазирование, аневризмы сосудов, тромбообразование и др. [7, 10]. Поскольку регуляторные регионы гена, кодирующего *VEGF-A*, как и регуляторные регионы генов *MMP*, полиморфны, возможно, что различный уровень их

экспрессии, определяемый полиморфизмом этих регионов, может быть ассоциирован с развитием отеков, свойственных лимфедеме.

Исходя из этого, мы проанализировали полиморфизм двух регуляторных регионов гена фактора роста эндотелия сосудов *VEGF-A* и полиморфизм промоторных регионов генов матриксных металлопротеиназ *MMP2*, *MMP3*, *MMP9* и их комбинаций у пациентов с первичной лимфедемой.

Материалы и методы

Пациенты

Выборка пациентов с первичной лимфедемой конечностей включала 72 человека (55 женщин и 17 мужчин) в возрасте от 18 до 81 года (45 (30-61)). Диагноз «лимфедема конечностей» установлен на основании данных анамнеза, клинического осмотра после исключения всех причин, способствующих развитию вторичной формы заболевания. У 7 пациентов диагноз подтвержден с помощью лимфосцинтиграфии нижних конечностей, по данным которой выявлены нарушения лимфодренажной функции нижних конечностей, у одного пациента — данными контрастной лимфографии в анамнезе. У большинства пациентов наблюдалось поражение одной конечности (52 пациента), тогда как двустороннее поражение отмечено у 30 пациентов. У 3 пациентов (4,2%) лимфедема зарегистрирована при рождении, у 17 (23,6%) пациентов в детском и подростковом возрасте (6 месяцев — 16 лет). У 45 (62,5%) пациентов заболевание характеризовалось как *lymphedema tarda*, у остальных 6 пациентов (8,3%) отмечено позднее начало заболевания (48-62 года). Наследственный характер заболевания наблюдался у 6 пациентов (5 с двусторонней формой поражения). Мультифазное поражение (лицо, верхние и нижние конечности) наблюдалось у 2 пациентов. Сочетание с ассоциированными синдромами у 3 пациентов (капиллярная гемангиома, хилорея, дистихаз). У 29 пациентов индекс массы тела соответствовал ожирению первой степени (3), второй степени (11) и третьей степени (15 пациентов). Именно у этих пациентов (17/29) наблюдались сопутствующие заболевания, связанные с метаболическим синдромом (гипертоническая болезнь, ИБС, сахарный диабет 2 типа, гонартроз). У пациентов с нормальным индексом массы тела или с избыточной массой тела частота этих заболеваний была достоверно ниже (2/43), но у них отмечались заболевания ЖКТ, железодефицитная анемия, гипотиреоз, дисплазия соединительной ткани и пр. В качестве наиболее частого триггерного фактора, способствующего появлению первых клинических признаков за-

болевания, выступала травма (12), затем рожающее воспаление (8) и беременность (3). Считается, что перечисленные состояния способствуют возникновению лимфедемы вследствие недостаточности функционального резерва лимфатического региона вследствие неполноценного развития лимфатического русла (лимфатических капилляров, лимфатических сосудов, их клапанов, лимфатических узлов). У 28 пациентов прогрессирование заболевания было связано с рецидивирующим характером течения рожающего воспаления — состояния, способствующего прогрессированию лимфатического отека. Нужно отметить появление клинической картины лимфедемы после однократного рожающего воспаления, возникает из-за недостаточности функционального резерва и расценивается как первичная форма заболевания, тогда как развитие заболевания вследствие нескольких рецидивов рожающего воспаления относится к вторичной лимфедеме.

Контрольная группа

В популяционную группу контроля включены 526 жителей г. Новосибирска (153 мужчины, 373 женщины) без хронических заболеваний, сопоставимые по возрасту с выборкой больных лимфедемой ($p = 0,711$ по критерию Манна–Уитни). Медиана по возрасту 48 лет (40–54).

Исследование проведено в рамках протокола клинического исследования «Персонализированное лечение лимфедемы конечностей на основе оценки дренажной функции и состояния интерстиция», одобренного локальным этическим комитетом НИИКЭЛ — филиала ИЦиГ СО РАН.

Генотипирование

Генотипирование полиморфизмов промоторного региона генов *VEGF* -2578 (rs 699947), *MMP3* -1171 (rs 3025058), *MMP9* -1562 (rs 3918242) осуществляли методом рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ), с использованием специфичных праймеров [19, 20] и эндонуклеаз рестрикции *Bgl* II, *Tth* I, *Sph* I соответственно (СибЭнзим, г. Новосибирск). Электрофорез проводили в 2,5% агарозном геле.

SNP полиморфизм регуляторных регионов генов *VEGF* +936 (rs 3025039) и *MMP2* -1306 (rs 2438650) анализировали с помощью Real-Time ПЦР с использованием коммерческих тест-систем методом TaqMan зондов (Синтол, Россия) на амплификаторе «ДТ-96» (ДНК-Технология) согласно инструкции фирмы-производителя.

Статистическая обработка

При статистическом анализе результатов исследований использовали такие показатели, как частота встречаемости генотипов, отношение шансов (OR) с расчетом 95% доверительно-

го интервала (OR 95%CI). Расчет величины OR проводили по методу Вульфа–Холдейна. Частоту встречаемости отдельных генотипов определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип, к общему числу обследованных в группе по формуле: $f = n/N$, где n — количество раз встречаемости генотипа, N — численность обследованных. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга. Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц.

Результаты

Исследовали особенности однонуклеотидного полиморфизма регуляторных регионов генов *VEGF* +936 C→T, *VEGF* -2578 C→A, *MMP2* -1306 C→T, *MMP3* -1171 5A→6A, *MMP9* -1562 C→T у пациентов с первичной лимфедемой (ПЛ) относительно группы здоровых лиц. Частоты генотипов анализируемых генов в группах соответствовали равновесию Харди–Вайнберга. Частоты *VEGF* -2578 и *VEGF* +936, *MMP3* -1171, *MMP9* -1562 генотипов значимо не отличались между группами, при этом частота *MMP2* -1306 CC генотипа у пациентов с первичной лимфедемой конечностей была значимо выше, чем в группе сравнения (табл. 1). Учитывая возможное синергетическое влияние нескольких полиморфных сайтов одного гена на изменение уровня его активности и то, что матриксные металлопротеиназы могут непосредственно участвовать в регуляции активности фактора роста эндотелия сосудов, образуя определенную регуляторную сеть, мы проанализировали частоту встречаемости комплекса полиморфных вариантов исследуемых генов, выявляемых в геноме каждого обследованного пациента (табл. 2). Из значительного количества возможных вариантов комбинаций анализируемых полиморфных позиций выявлено 15 комплексных генотипов, позитивно ассоциированных с заболеванием. Один из них — *VEGF* -2578 CA/+936 CC — объединяет две позиции регуляторных локусов, одна из которых расположена в промоторном регионе, а другая в 3' фланкирующем регионе гена. Еще восемь комплексных генотипов включают комбинацию двух полиморфных сайтов гена *VEGF*, причем *VEGF* -2578 везде представлена только в гетерозиготном варианте, а *VEGF* +936 как CC, так и TT гомозиготой, в зависимости от включенного в комплекс генотипа матриксной металлопротеиназы. В четырех комплексных генотипах *VEGF* представлен исключительно полиморфной позицией фланкирующего региона гена, два генотипа представлены ком-

ТАБЛИЦА 1. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМОЙ

TABLE 1. FEATURES OF DISTRIBUTION OF GENOTYPES FREQUENCIES OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENES AT PATIENTS WITH PRIMARY LYMPHEDEMA

Полиморфная позиция Polymorphic position	Генотип Genotype	Пациенты с первичной лимфедемой Patients with primary lymphedema	Здоровые Healthy	OR	OR_CI95	P_tmF2
VEGF -2578 n = 72 n1 = 397	CC	18 (25,00)	106 (26,70)	0,92	0,51-1,63	0,8846
	CA	41 (56,94)	210 (52,90)	1,18	0,71-1,95	0,6078
	AA	13 (18,06)	81 (20,40)	0,86	0,45-1,64	0,7498
VEGF +936 n = 72 n1 = 352	CC	57 (79,17)	259 (73,58)	1,36	0,74-2,53	0,3745
	CT	11 (15,28)	82 (23,30)	0,59	0,30-1,18	0,1600
	TT	4 (5,56)	11 (3,13)	1,82	0,56-5,90	0,2979
MMP2 -1306 n = 72 n1 = 319	TT	3 (4,17)	25 (7,84)	0,51	0,15-1,74	0,4458
	TC	18 (25,00)	112 (35,11)	0,62	0,34-1,10	0,1272
	CC	51 (70,83)	182 (57,05)	1,83	1,05-3,18	0,0338
MMP3 -1171 n = 72 n1 = 88	55	20 (27,78)	18 (20,45)	1,50	0,72-3,11	0,3509
	56	26 (36,11)	41 (46,59)	0,65	0,34-1,23	0,2003
	66	26 (36,11)	29 (32,95)	1,15	0,60-2,21	0,7389
MMP9 -1562 n = 72 n1 = 388	CC	50 (69,44)	271 (69,85)	0,98	0,57-1,69	1,0000
	CT	19 (26,39)	97 (25,00)	1,08	0,61-1,91	0,7700
	TT	3 (4,17)	20 (5,15)	0,80	0,23-2,77	1,0000

Примечание. n – количество обследованных пациентов с лимфедемой, n1 – количество обследованных в группе сравнения, OR – отношение шансов, OR_CI 95 – 95%-й доверительный интервал для OR, P_tmF2 – значимость различий по 2-стороннему варианту точного метода Фишера.

Note. n, quantity of the patients with lymphedema; n1, quantity surveyed in group of comparison; OR, Odds ratio; OR_CI95, 95% confidence interval; P_tmF2, bilateral Fisher's exact test.

плексом генов матриксных металлопротеиназ. В шести комплексах представлен гомозиготный генотип *MMP2 -1306 CC*, частота которого повышена у пациентов с ПЛ. При этом максимальные значения отношения шансов развития патологии у носителей комплексов *VEGF -2578 CA/VEGF +936 TT/MMP9 -1562 CT* (OR = 14,37, P = 0,0303) и *VEGF -2578 CA/VEGF +936 TT/MMP2 -1306 CC/MMP9 -1562 CT* (OR = 12,21, P = 0,0396).

Для графической визуализации выявленных нами генных композиций, представленных в таблице 2, и выделения среди них главных генов и межгенных взаимодействий мы провели с помощью биоинформационной платформы Cytoscape компьютерное моделирование сетевых взаимодействий различных генотипов *MMP* и *VEGF*, вовлеченных в регуляцию процессов деструкции и ангиогенеза при формировании предрасположенности к первичной лимфедеме (рис. 1).

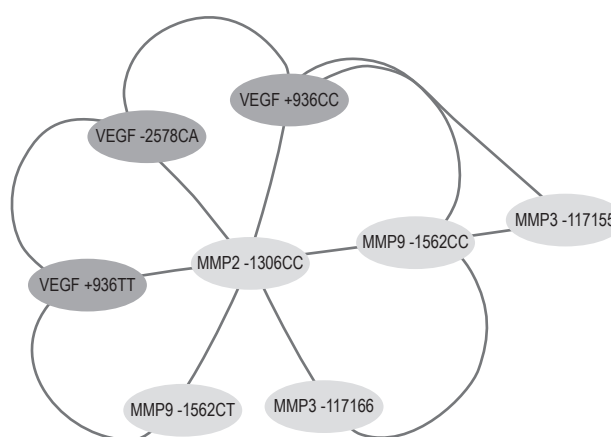


Рисунок 1. Графическая визуализация MMP-VEGF генной сети, позитивно ассоциированной с развитием первичной лимфедемы

Figure 1. Graphic visualization of MMP-VEGF genic network which positively associated with development of primary lymphedema

ТАБЛИЦА 2. КОМПЛЕКСНЫЕ ГЕНОТИПЫ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ, ПОЗИТИВНО АССОЦИИРОВАННЫЕ С РАЗВИТИЕМ ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМЫ

TABLE 2. COMPLEX GENOTYPES OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENES WHICH POSITIVELY ASSOCIATED WITH PRIMARY LYMPHEDEMA

Полиморфные позиции Polymorphic position	Генотип Genotype	Пациенты с первичной лимфедемой Patients with primary lymphedema	Здоровые Healthy	OR	OR_CI95	P_tmF2
VEGF -2578:VEGF +936	CA-CC	35 (48,61)	123 (35,76)	1,70	1,02-2,84	0,0457
VEGF +936:MMP2 -1306	CC-CC	41 (56,94)	120 (40,40)	1,95	1,16-3,28	0,0121
VEGF +936:MMP9 -1562	TT-CT	3 (4,17)	2 (0,58)	7,48	1,23-45,60	0,0379
MMP2 -1306:MMP9 -1562	CC-CC	37 (51,39)	117 (37,62)	1,75	1,05-2,94	0,0338
MMP3 -1171:MMP9 -1562	55-CC	16 (22,22)	9 (10,23)	2,51	1,03-6,08	0,0488
VEGF -2578:VEGF +936: MMP2 -1306	CA-CC-CC	27 (37,50)	60 (20,62)	2,31	1,33-4,02	0,0051
VEGF -2578:VEGF +936: MMP9 -1562	CA-CC-CC	27 (37,50)	84 (24,78)	1,82	1,06-3,12	0,0399
VEGF -2578:VEGF +936: MMP9 -1562	CA-TT-CT	2 (2,78)	0 (0,00)	14,37	1,47-140,12	0,0303
VEGF -2578:MMP2 -1306: MMP9 -1562	CA-CC-CC	24 (33,33)	66 (21,64)	1,81	1,03-3,17	0,0453
VEGF +936:MMP2 -1306: MMP9 -1562	CC-CC-CC	31 (43,06)	75 (25,51)	2,21	1,29-3,77	0,0055
VEGF +936:MMP3 -1171: MMP9 -1562	CC-55-CC	15 (20,83)	6 (6,82)	3,60	1,32-9,83	0,0104
VEGF -2578:VEGF +936: MMP2 -1306:MMP3 -1171	CA-CC-CC-66	10 (13,89)	29 (2,35)	6,69	1,42-31,65	0,0127
VEGF -2578:VEGF +936: MMP2 -1306:MMP9 -1562	CA-CC-CC-CC	22 (30,56)	39 (13,54)	2,81	1,53-5,14	0,0013
VEGF -2578:VEGF +936: MMP2 -1306:MMP9 -1562	CA-TT-CC-CT	2 (2,78)	0 (0,00)	12,21	1,25-119,15	0,0396
VEGF -2578:VEGF +936: MMP2 -1306:MMP3 -1171: MMP9 -1562	CA-CC-CC-66-CC	8 (11,11)	2 (2,35)	5,19	1,06-25,27	0,0445

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

Анализ топологии геной сети, представленной на данном рисунке, позволил нам выделить главные гены и главные межгенные взаимодействия, которые вносят наибольший вклад в развитие первичной лимфедемы. На наш взгляд, в качестве главных маркеров могут выступать три полиморфизма: *MMP2 -1306 CC*, *MMP9 -1562 CC*

и *VEGF +936 CC*. Эти гены формируют основные узлы в геной сети, поскольку имеют наибольшее количество взаимодействий с другими генами. Именно они формируют главные межгенные взаимодействия: [*VEGF +936 CC:MMP2 -1306 CC*] (20%), [*VEGF -2578 CA:VEGF +936 CC*] (20%), [*MMP2 -1306 CC:MMP9 -1562 CC*] (13%), на долю

ТАБЛИЦА 3. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ ГЕНОТИПОВ ГЕНОВ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ И ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ У ПАЦИЕНТОВ С ПЕРВИЧНОЙ ЛИМФЕДЕМОЙ С ОЖИРЕНИЕМ И НОРМАЛЬНЫМ ИНДЕКСОМ МАССЫ ТЕЛА

TABLE 3. FEATURES OF DISTRIBUTION OF GENOTYPES FREQUENCIES OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENES AT PATIENTS WITH PRIMARY LYMPHEDEMA WITH ADIPOSITY AND NORMAL BODY MASS INDEX

Полиморфная позиция Polymorphic position	Генотип Genotype	Пациенты с первичной лимфедемой и ИМТ > 30 Patients with primary lymphedema and BMI > 30 n = 29	Пациенты с первичной лимфедемой и ИМТ < 25 Patients with primary lymphedema and BMI < 25 n = 24	OR	OR_CI95	P_tmF2
VEGF -2578	CC	7 (24,14)	6 (25,00)	0,95	0,27-3,35	1,0000
VEGF -2578	CA	14 (48,28)	16 (66,67)	0,47	0,15-1,43	0,2660
VEGF -2578	AA	8 (27,59)	2 (8,33)	4,19	0,80-22,06	0,0915
VEGF +936	CC	24 (82,76)	19 (79,17)	1,26	0,32-5,01	1,0000
VEGF +936	CT	4 (13,79)	2 (8,33)	1,76	0,29-10,56	0,6779
VEGF +936	TT	1 (3,45)	3 (12,50)	0,25	0,02-2,58	0,3178
MMP2 -1306	TT	1 (3,45)	1 (4,17)	0,82	0,05-13,87	1,0000
MMP2 -1306	TC	7 (24,14)	8 (33,33)	0,64	0,19-2,12	0,5467
MMP2 -1306	CC	21 (72,41)	15 (62,50)	1,58	0,49-5,03	0,5575
MMP3 -1171	5A5A	9 (31,03)	4 (16,67)	2,25	0,59-8,52	0,3381
MMP3 -1171	5A6A	13 (44,83)	8 (33,33)	1,63	0,53-4,98	0,4160
MMP3 -1171	6A6A	7 (24,14)	12 (50,00)	0,32	0,10-1,02	0,0836
MMP9 -1562	CC	21 (72,41)	14 (58,33)	1,88	0,59-5,92	0,3841
MMP9 -1562	CT	7 (24,14)	8 (33,33)	0,64	0,19-2,12	0,5467
MMP9 -1562	TT	1 (3,45)	2 (8,33)	0,39	0,03-4,62	0,5841
VEGF +936:MMP3 -1171	CC-6A6A	4 (13,79)	10 (41,67)	0,22	0,06-0,85	0,0303
VEGF +936:MMP3 -1171: MMP9 -1562	CC-5A6A-CC	10 (34,48)	2 (8,33)	5,79	1,13-29,77	0,0452
VEGF +936:MMP3 -1171: MMP9 -1562	CC-6A6A-CC	2 (6,90)	8 (33,33)	0,15	0,03-0,79	0,0307

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. As for Table 1.

которых приходится 53% от всех взаимодействий в геной сети.

Поскольку лимфедема, независимо от причины, часто осложняется рожистым воспалением, которое вызывает облитерацию оставшихся лимфатических сосудов, результатом чего является прогрессирование, мы провели анализ полиморфизма генов *VEGF* и *MMP* у пациентов с ПЛ в зависимости от наличия или отсутствия рожистого

воспаления. Однако нами не выявлено каких-либо различий в распределении частот между этими группами по исследуемым генам. Комплексный анализ также не выявил различий между данными группами. Напротив, выявлен ряд достоверно различающихся комплексных генотипов у пациентов с ПЛ с нормальным ИМТ (менее 25) и ожирением (ИМТ более 30) (табл. 3). Так, частота комплексного генотипа *VEGF+936CC:MMP3*

-1171 5A6A:MMP9 -1562 CC у пациентов с ожирением повышена более чем в пять с половиной раз относительно пациентов с нормальным ИМТ.

Обсуждение

Несмотря на то, что выявлены некоторые ключевые детерминанты лимфангиогенеза, такие как факторы роста эндотелия сосудов VEGF-C/D, VEGFR 3 рецептор, транскрипционный фактор Prox1, мембранный гликопротеин подоплатин (PDPN), эндотелиальный рецептор-1 гиалуронана лимфатических сосудов (LYVE-1) и др. [21], генетическая составляющая патологии, связанной с лимфатической системой, на сегодняшний день остается недостаточно ясной. Мы проанализировали пять однонуклеотидных полиморфизмов в регуляторных областях трех генов, продукты которых могут быть ассоциированы с нарушениями лимфотока.

Достоверные различия между группами выявлены в нашем исследовании только в распределении частот *MMP2* генотипов, причем у пациентов с ПЛ повышена частота *MMP2 -1306 CC* генотипа. Полиморфизм гена *MMP2 C (-1306) T*, как известно, нарушает промоторный сайт Sp1-типа (бокс CCACC), что приводит к снижению активности промотора, связанной с аллелем *T* [16]. Показано, что уровень *MMP-2* mRNA выше у пациентов с нарушениями лимфотока конечностей относительно пациентов без таковых нарушений, а блокировка или экспериментальное снижение активности гена приводят к снижению лимфангиогенеза [8, 11]. Повышение частот генотипов, ассоциированных с более высоким уровнем продукции гена *MMP2* в других полиморфных сайтах, было выявлено при обследовании пациентов с развитием лимфедемы. Авторы предполагают, что увеличенное количество *MMP-2* может изменять и реконструировать экстрацеллюлярную матрицу вокруг сосудов и тем самым способствовать развитию патологии. Ими же выдвигается другая гипотеза, что *MMP-2* способствует нарушению плотности сосудов и трансудации жидкости из сосудов в ткани, стимулируя тем самым образование отеков [10, 17, 24]. Данные эффекты могут быть реализованы через макрофаги, количество которых в лимфедематозных тканях существенно увеличивается, при этом они влияют на экспрессию фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) [23, 25]. Также макрофаги стимулируют фиброз, продуцируя профибротические цитокины, такие как трансформирующий фактор роста, активируя фибробласты, стимулируя миграцию миофибробластов, увеличивая синтез коллагена, и содействуют расщеплению продуктов внеклеточного матрикса путем увеличения продукции матричных металлопротеиназ

и снижения экспрессии профибротических цитокинов [12]. Кроме того, показано, что *MMP-2 in vivo* может проявлять себя как коллагеназа, а не как классическая желатиназа, что также способствует патологическому лимфангиогенезу [11].

Несмотря на то, что анализ других проанализированных нами полиморфных генов не показал различий между группами, анализ комплексных генотипов выявил ряд комплексов, позитивно ассоциированных с развитием ПЛ, причем отношения шансов развития болезни у носителей данных сложных генотипов достаточно высоки. Выявлены позитивно ассоциированные с ПЛ комплексы как с наличием *MMP2 -1306 CC* генотипа, так и без него, что указывает на сложные генетические сетевые взаимодействия, реализуемые в предрасположенности к болезни, даже при отсутствии однонуклеотидных ассоциаций. Подобные закономерности были показаны нами и при анализе ряда других патологий [2]. Поскольку гены, включенные в комплексный анализ, отражают сетевые взаимодействия их продуктов, подобный подход может являться важным звеном раннего прогноза развития нарушений лимфотока конечностей. Выявленные нами сетевые взаимодействия, визуализированные на рисунке 1, подтверждаются и современными методами математического моделирования. Сложные сетевые взаимодействия генов при развитии лимфедемы были показаны ранее методом математического моделирования с использованием пакета программ MetaCore. Показано, что высокая экспрессия VEGF-A увеличивает уровни *MMP-2*. Одновременно *MMP2* регулирует *MMP9* и ряд других генов [13]. Аналогичные сетевые взаимодействия выявлены и для ряда других заболеваний [14], что указывает на важность учета синергетических эффектов при анализе ассоциаций определенных генов с заболеванием.

Таким образом, полученные данные могут свидетельствовать об определенном значении полиморфизма матричных металлопротеиназ, в частности *MMP2*, на патогенез развития первичной лимфедемы конечностей. Изменения структуры внеклеточного матрикса, происходящие вследствие нарушений лимфатического оттока, могут быть обусловлены нарушениями процессов его ремоделирования, развития фиброза и хронического воспаления, регулируемые в том числе матричной металлопротеиназой *MMP2*. Построение генных сетей транскрипционной регуляции и их топологический анализ позволяет строить и изучать структурно-функциональную организацию ген-генных взаимодействий применительно к исследованию патогенеза первичной лимфедемы для разработки в последующем подходов к персонифицированной профилактике и терапии.

Список литературы / References

1. Повещенко А.Ф., Нимаев В.В., Любарский М.С., Коненков В.И. Медицинские и генетические аспекты лимфедемы // Медицинская генетика, 2010. № 9. С. 3-9. [Poveshchenko A.F., Nimaev V.V., Lubarsky M.S., Konenkov V.I. Medical and genetical aspects of lymphedema. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*, 2010, no. 9, pp. 3-9. (In Russ.)]
2. Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Королев М.А., Омельченко В.О., Коненков В.И. Полиморфизм генов эндотелиальной дисфункции, коактиваторов митохондриального биогенеза и плазминоген-плазминовой системы в развитии кардиоваскулярных осложнений при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология, 2018. Т. 56, № 1. С. 55-59. [Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Korolev M.A., Omelchenko V.O., Konenkov V.I. Gene polymorphisms of endothelial dysfunction, coactivators of mitochondrial biogenesis and plasminogen/plasmin system in the development of cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2018, Vol. 56, no. 1, pp. 55-59. (In Russ.)]
3. Aspelund A., Robciuc M.R., Karaman S., Makinen T., Alitalo K. Lymphatic system in cardiovascular medicine. *Circ. Res.*, 2016, Vol. 118, pp. 515-530.
4. Bennuru S., Nutman T.B. Lymphangiogenesis and lymphatic remodeling induced by filarial parasites: implications for pathogenesis. *PLoS Pathog.*, 2009, Vol. 5, no. 12, e1000688. doi: 10.1371/journal.ppat.1000688.
5. Bennuru S., Maldarelli G., Kumaraswami V., Klion A.D., Nutman T.B. Elevated levels of plasma angiogenic factors are associated with human lymphatic filarial infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2010, Vol. 83, no. 4, pp. 884-890.
6. Bruyere F., Melen-Lamalle L., Blacher S., Roland G., Thiry M., Moons L., Frankenne F., Carmeliet P., Alitalo K., Libert C., Sleeman J.P., Foidart J.M., Noël A. Modeling lymphangiogenesis in a three-dimensional culture system. *Nat. Methods.*, 2008, Vol. 5, no. 5, pp. 431-437.
7. Chou Y.-E., Chen W.-H., Luo C.-B., Yang S.-F. Polymorphism in dural arteriovenous fistula: matrix metalloproteinase-2-1306 C/T as a potential risk factor for sinus thrombosis. *J. Throm. Haemost.*, 2018, Vol. 16, no. 4, pp. 802-808.
8. Couto R.A., Kulungowski A.M., Chawla A.S., Fishman S.J., Greene A.K. Expression of angiogenic and vasculogenic factors in human lymphedematous tissue. *Lymphat. Res. Biol.*, 2011, Vol. 9, no. 3, pp. 143-149.
9. Debrah A.Y., Mand S., Toliat M.R., Marfo-Debrekyei Y., Batsa L., Nürnberg P., Lawson B., Adjei O., Hoerauf A., Pfarr K. Plasma vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-A gene polymorphism are associated with hydrocele development in lymphatic filariasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2007, Vol. 77, no. 4, pp. 601-608.
10. Debrah L.B., Albers A., Debrah A.Y., Brockschmidt F.F., Becker T., Herold C., Hofmann A., Osei-Mensah J., Mubarik Y., Fröhlich H., Hoerauf A., Pfarr K. Single nucleotide polymorphisms in the angiogenic and lymphangiogenic pathways are associated with lymphedema caused by *Wuchereria bancrofti*. *Hum. Genomics*, 2017, Vol. 11, no. 1, 26. doi: 10.1186/s40246-017-0121-7.
11. Detry B., Erpicum C., Paupert J., Blacher S., Maillard C., Bruyere F., Pendeville H., Rémacle T., Lambert V., Balsat C., Ormenese S., Lamaye F., Janssens E., Moons L., Cataldo D., Kridelka F., Carmeliet P., Thiry M., Foidart J.-M., Struman I., Noe A. Matrix metalloproteinase-2 governs lymphatic vessel formation as an interstitial collagenase. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 21, pp. 5048-5056.
12. Duffield J.S., Forbes S.J., Constandinou C.M., Clay S., Partolina M., Vuthoori S., Wu S., Lang R., Iredale J.P. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, no. 1, pp. 56-65.
13. Froehlich H., Fellmann M., Sueltmann H., Poustka A., Beissbarth T. Large scale statistical inference of signaling pathways from RNAi and microarray data. *BMC Bioinformatics.*, 2007, Vol. 8, no. 1, 386. doi:10.1186/1471-2105-8-386.
14. Gong J., Zhu S., Zhang Y., Wang J. Interplay of VEGF a and MMP2 regulates invasion of glioblastoma. *Tumour Biol.*, 2014, Vol. 35, no. 12, pp. 11879-11885.
15. Heckman C.A., Holopainen T., Wirzenius M., Keskitalo S., Jeltsch M., Ylä-Herttuala S., Wedge S.R., Jürgensmeier J.M., Alitalo K. The tyrosine kinase inhibitor cediranib blocks ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 activity and lymphangiogenesis. *Cancer Res.*, 2008, Vol. 68, no. 12, pp. 4754-4762.
16. Jacob-Ferreira A.L.B., Lacchini R., Gerlach R., Passos C.J., Barbosa F.Jr, Tanus-Santos J. A common matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphism affects plasma MMP-2 levels in subject environmentally exposed to mercury. *Sci. Total Environ.*, 2011, Vol. 409, no. 20, pp. 4242-4246.
17. Kelly M.A., Shuaib A., Todd K.G. Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp. Neurol.*, 2006, Vol. 200, no. 1, pp. 38-49.
18. Mac Gabhann F., Qutub A.A., Annex B.H., Popel A.S. Systems biology of pro-angiogenic therapies targeting the VEGF system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.*, 2010, Vol. 2, no. 6, pp. 694-707.
19. Nagy J.A., Vasile E., Feng D., Sundberg C., Brown L.F., Detmar M.J., Lawitts J.A., Benjamin L., Tan X., Manseau E.J., Dvorak A.M., Dvorak H.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, no. 11, pp. 1497-1506.
20. Okamoto K., Mimura K., Murawak Y., Yuasa I. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J. Gastr. Hepatol.*, 2005, Vol. 20, no. 7, pp. 1102-1108.

21. Renner W., Kotschan S., Hoffmann C., Obermayer-Pietsch B., Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J. Vasc. Res.*, 2000, Vol. 37, pp. 443-448.
22. Rigo J.Jr. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe preeclampsia. *Mol. Hum. Reprod.*, 2006, Vol. 12, pp. 233-236.
23. Tammela T., Alitalo K. Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. *Cell*, 2010, Vol. 140, no. 4, pp. 460-476.
24. Whitehurst B., Flister M.J., Bagaitkar J., Volk L., Bivens C.M., Pickett B., Castro-Rivera E., Brekken R.A., Gerard R.D., Ran S. AntiVEGF-A therapy reduces lymphatic vessel density and expression of VEGFR-3 in an orthotopic breast tumor model. *Int. J. Cancer*, 2007, Vol. 121, no. 10, pp. 2181-2191.
25. Wiczór R., Wiczór A.M., Gadomska G., Stankowska K., Fabisiak J., Suppan K., Pulkowski G., Budzyński J., Rość D. Overweight and obesity versus concentrations of VEGF-A, sVEGFR-1, and sVEGFR-2 in plasma of patients with lower limb chronic ischemia. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, 2016, Vol. 17, no. 11, pp. 842-849.
26. Wynn T.A., Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin. Liver Dis.*, 2010, Vol. 30, no. 3, pp. 245-257.
27. Yang Y., Estrada E.Y., Thompson J.F., Liu W., Rosenberg G.A. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2007, Vol. 27, no. 4, pp. 697-709.
28. Zampell J.C., Yan A., Elhadad S., Avraham T., Weitman E., Mehrara B.J. CD4⁺ cells regulate fibrosis and lymphangiogenesis in response to lymphatic fluid stasis. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 11, e49940. doi: 10.1371/journal.pone.0049940.

Авторы:

Шевченко А.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Прокофьев В.Ф. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Коненков В.И. — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель лаборатории клинической иммуногенетики, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Хапаев Р.С. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории оперативной лимфологии и лимфодетоксикации, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Нимаев В.В. — д.м.н., заведующий лабораторией оперативной лимфологии и лимфодетоксикации, Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shevchenko A.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Prokofyev V.F., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Konenkov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Khapaev R.S., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Surgical Lymphology and Lymphodetoxication, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Nimaev V.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Surgical Lymphology and Lymphodetoxication, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 13.12.2019
Отправлена на доработку 29.01.2020
Принята к печати 08.03.2020

Received 13.12.2019
Revision received 29.01.2020
Accepted 08.03.2020